

ANIONENPERMEABILITÄT DER LIPOSOMEN

UNTERSUCHUNGEN MIT UND OHNE ANIONENCARRIER

Inaugural - Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich Biochemie und Pharmazie

der Johann Wolfgang Goethe-Universität

zu Frankfurt am Main

von

Karin Obermeier

(geb. Sihoruf)

geb. in Schrobenhausen (Obb.)

Frankfurt am Main

1975

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. H. Passow für die Überlassung des Themas und die verständnisvolle Förderung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Dr. H. Fasold danke ich für seine wertvolle Unterstützung.

Dekan: Prof. Dr. G. Schneider

1. Gutachter: Prof. Dr. Dr. H. Fasold

2. Gutachter: Prof. Dr. H. Passow

Tag der mündl. Prüfung: 28. Feb. 1975

ALLGEMEINER TEIL

I. Biologische Membranen

Seit dem Wissen um die Existenz von Zellmembranen wird nach der Ursache ihrer Eigenschaften, Struktur und Funktion, als auch nach der Art ihrer Komponenten und deren Wechselwirkungen geforscht.

Als Hauptkomponenten der Zellmembran wurden Lipide, Proteine und Kohlenhydrate gefunden. Es zeigte sich, daß die Membranproteine neben strukturellen Aufgaben, auch für funktionelle Eigenschaften, wie die selektive Ionenpermeabilität, mitverantwortlich sind (1). Die Aufgabe der Lipide, mit Ausnahme ihrer Matrixfunktion im Membrangerüst, ist noch weitgehend unerforscht.

II. Membranmodelle

Versuche mit Membranmodellen begannen bereits im letzten Jahrhundert (2). Zu den heute häufig verwendeten Modellen zählen die "black lipid membranes" und die Liposomen. Letztere sind Vesikel, deren Wandungen aus bimolekularen Lipidschichten bestehen und ähnlich den natürlichen Zellmembranen ein hydrophobes Membran-Inneres aufweisen. Für den Transport von polaren Molekülen oder Ionen ist somit eine hohe Aktivierungsenergie erforderlich, die durch einen durch Carrier oder Poren bewerkstelligten Transport herabgesetzt sein kann.

In der vorliegenden Arbeit wurden Liposomen als Membranmodell verwendet um einige Probleme der Anionenpermeabilität und der Carrierfunktion eines cyclischen Diamins zu untersuchen, das für diese Zwecke freundlicherweise von Simmons und Park zur Verfügung gestellt wurde.

ERGEBNISSE

I. Charakterisierung und Aufbau des Liposomen-Membranmodells

Zur Herstellung einschaliger Liposomen werden mehrschalige Liposomen oder das getrocknete Lipid in einer Salzlösung der Ultraschallbestrahlung bis zur minimalen UV-Absorption ausgesetzt. Unter Berücksichtigung von Temperatur, Zeit und Konzentration wurden optimale Bedingungen für die reproduzierbare Darstellung einschaliger Liposomen ausgearbeitet. Die Einheitlichkeit der Vesikelgröße wurde mit einer Sepharose 4B-Säule nachgewiesen. Eine Sephadex G50-Säule diente zur Entfernung des extrazellulären Salzes. Der überwiegende Teil der Flußmessungen wurde mit Hilfe der Dialyse ausgeführt. Dazu wurde eine neue Dialyseapparatur entwickelt, wodurch bei jedem Experiment gleiche geometrische Verhältnisse vorlagen. In Anlehnung an Untersuchungen des Anionentransportes der Erythrozyten (3) wurden mit Hilfe von radioaktiv markiertem Cl^- - und SO_4^{2-} Austausch- und Nettofluß gemessen. Zur Messung des Austauschflusses wurden die Liposomen, die eine bestimmte Anionensorte einschließen, in ein Medium, das die gleiche oder eine andere Anionensorte enthält, suspendiert. Da die Membran impermeabel für Kationen ist, beschränkt sich der Transport unter diesen Bedingungen auf den Austausch äquivalenter Mengen von Anionen. Zur Messung des Nettoflusses wurde die Membran mittels eines geeigneten Carrier-Antibiotikum (Valinomycin) kationenpermeabel gemacht und dann der Fluß des aus Kation und Anion bestehenden Elektrolyten gemessen. Die Versuchsergebnisse zeigten, daß der Austauschfluß in der Reihenfolge $\text{J}^- > \text{Cl}^- > \text{SO}_4^{2-}$ abnimmt. Für den Nettofluß gilt $\text{J}^- > \text{Cl}^- = \text{SO}_4^{2-}$; Zahlenwerte sind in Tabelle 1 zusammengestellt.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41550826_0050

Cl⁻- Austauschfluß in Abhängigkeit vom pH

Lecithin:Cholesterin=1:1 Liposomen; intra-

zellulär 100mMol KCl (10mMol Glycylglycin pH 7,0)

extrazellulär 100mMol KCl (10 mMol Glycylglycin-
puffer pH 3 - 10); 6°C.

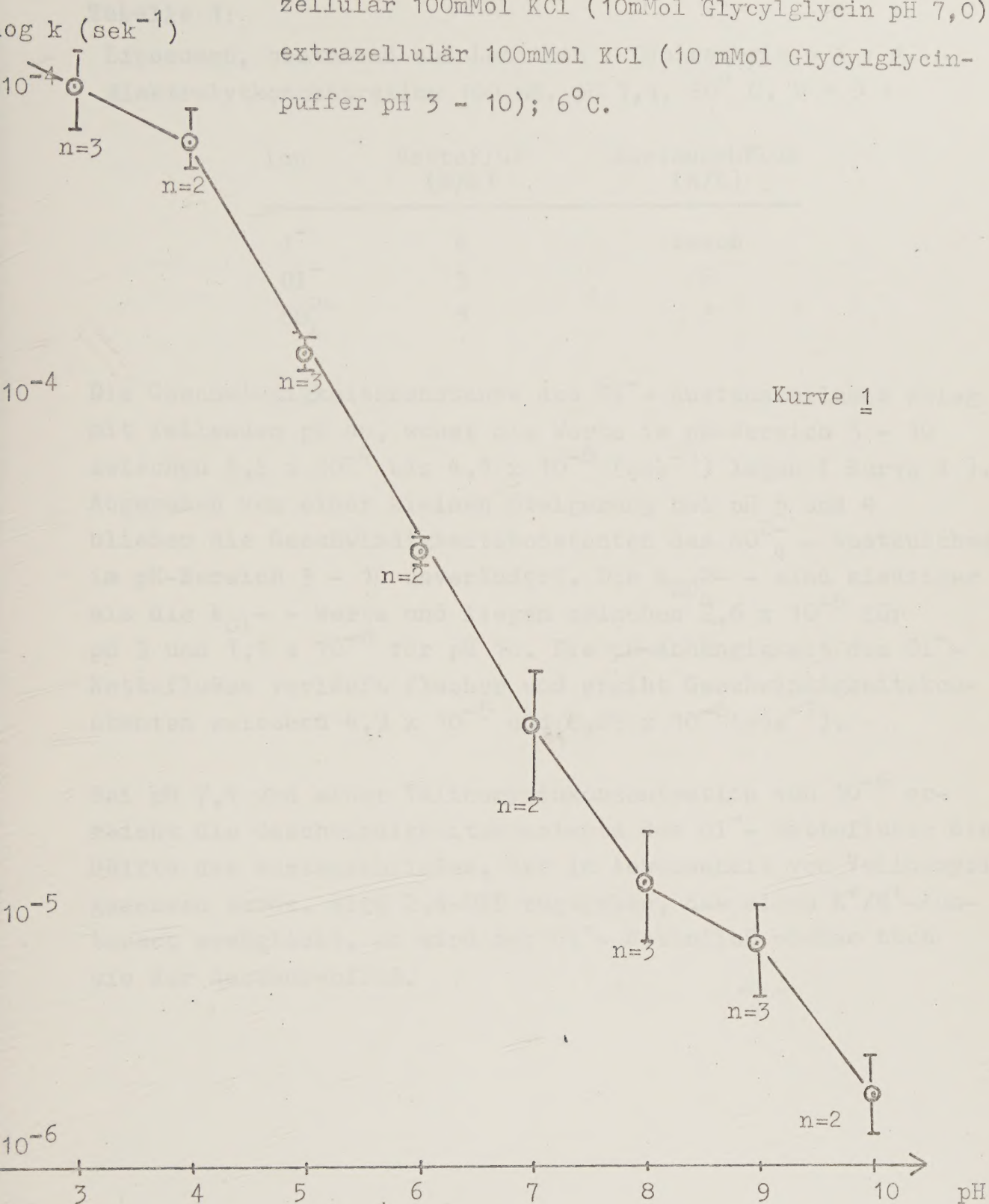


Tabelle 1:

Liposomen, bestehend aus Lecithin : Cholesterin = 1 : 1,
Elektrolytkonzentration 100 mM, pH 7,4, 20° C, n = 3 :

Ion	Nettofluß (%/h)	Austauschfluß (%/h)
J^-	6	rasch
Cl^-	3	6
SO_4^{2-}	3	3

Die Geschwindigkeitskonstante des Cl^- - Austauschflusses stieg mit fallendem pH an, wobei die Werte im pH-Bereich 3 - 10 zwischen $3,8 \times 10^{-4}$ bis $4,1 \times 10^{-6}$ (sek^{-1}) lagen (Kurve 1). Abgesehen von einer kleinen Steigerung bei pH 3 und 4 blieben die Geschwindigkeitskonstanten des SO_4^{2-} - Austausches im pH-Bereich 3 - 10 unverändert. Die $k_{SO_4^{2-}}$ - sind niedriger als die k_{Cl^-} - Werte und liegen zwischen $2,6 \times 10^{-6}$ für pH 3 und $1,1 \times 10^{-6}$ für pH 10. Die pH-Abhängigkeit des Cl^- - Nettoflusses verläuft flacher und ergibt Geschwindigkeitskonstanten zwischen $4,9 \times 10^{-5}$ und $6,25 \times 10^{-6}$ (sek^{-1}).

Bei pH 7,4 und einer Valinomycinkonzentration von 10^{-6} erreicht die Geschwindigkeitskonstante des Cl^- - Nettoflusses die Hälfte des Austauschflusses, der in Abwesenheit von Valinomycin gemessen wurde. Wird 2,4-DNP zugegeben, das einen K^+/H^+ -Austausch ermöglicht, so wird der Cl^- - Nettofluß ebenso hoch wie der Austauschfluß.

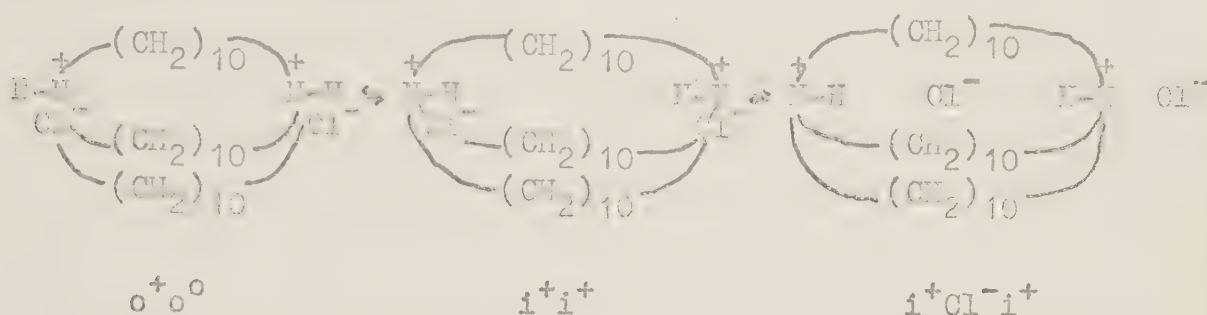
Tabelle 2:

Liposomen, bestehend aus Lecithin : Cholesterin = 1 : 1, intrazellulär 100 mM KCl, pH 7,4, extrazellulär 100 mM NaCl pH 7,4, 10 mM Glycylglycin-Puffer, 28°C, n = Anzahl der durchgeführten Versuche:

	k (sek ⁻¹)	SD	n
ohne Zusätze.	5,59 x 10 ⁻⁵	±0,10	4
+ C ₂ H ₅ OH (6 % v/v)	6,41 x 10 ⁻⁵	±0,63	3
+ Valinomycin 10 ⁻⁷ M	8,30 x 10 ⁻⁵	±0,81	3
+ Valinomycin 10 ⁻⁶ M	9,00 x 10 ⁻⁵	±0,12	3
+ {Valinomycin 10 ⁻⁶ M 2,4-DNP 10 ⁻⁴ M	1,38 x 10 ⁻⁴	±0,03	2

II. Untersuchung eines 1, (k+2)-Diazabicyclo(k,1,m)-alkan auf dessen Carrierfunktion mit Hilfe des Lipo-somensystems

Die untersuchte Substanz stellt ein makrobicyclisches Diamin der allgemeinen Formel 1, (k+2)-Diazabicyclo(k,1,m)-alkan dar. Drei symmetrische Diamine der Kettenlänge $k = 1 = m = 10$, $k = 1 = m = 12$ und $k = 1 = m = 14$ standen zur Verfügung. NMR-Messungen von Simmons und Park (4) zeigten, daß die Verbindungen mit Kettenlängen größer 10 in Trifluoressigsäure Cl^- , Br^- und J^- zu inkapsulieren vermögen und dabei durch N-Inversion drei Formen auftreten.



Ein Maß für die Lipidlöslichkeit und damit der Carrierfunktionsfähigkeit einer Substanz ist der Verteilungskoeffizient V_k zwischen wäßriger und Lipidphase.

Bei der Bestimmung des V_k wurde als organische Phase (die dem unpolaren Membraninneren entspricht) meist ein Gemisch aus Butanol : Toluol = 1 : 1 verwendet. Ihr wurde zu Beginn des Versuches das unprotonierte Diamin zugesetzt. Als zweite Phase (die dem extrazellulären Medium entspricht) wurde eine Pufferlösung des gewünschten pH-Wertes verwendet und darin das radioaktiv markierte Anion gelöst. Die nach Äquilibrierung erreichte Gleichgewichtsverteilung des Anions zwischen organischer und wäßriger Phase hing vom Verhältnis der zugesetzten Mengen an Diamin und Anion ab. Bei einem Verhältnis von Diamin : Anion von 15 : 1 befand sich praktisch die gesamte Menge des Anions in der wäßrigen Phase. Beim Überschreiten dieses

dieses Verhältnisses waren mehr als 95 % des Anions in der organischen Phase. Die Ursache für die sprunghafte Änderung des Verteilungskoeffizienten konnte mangels ausreichender Mengen an Diamin nicht geklärt werden.

Die pH-Abhängigkeit der V_k Bestimmung (gemessen bei einem Verhältnis von Diamin : Anion von 20 : 1) zeigte für Cl^- und SO_4^{2-} ein Maximum. Dabei war die Lage des Maximums nicht genau reproduzierbar. Das Maximum für SO_4^{2-} lag jedoch im Durchschnitt bei niedrigerem pH als für Cl^- .

Die dünnschichtchromatische Untersuchung der Phasen zeigte den Carriereffekt. Das Cl^- -freie, unprotonierte Diamin aus der organischen Phase besitzt in $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ als Laufmittel (mit J_2 angefärbt) einen $R_f = 0,9$. Nach Einstellung des Verteilungsgleichgewichts zeigte die Butanol/Toluol-Phase zwei Flecken für das Diamin, einen mit $R_f = 0$, einen anderen mit $R_f = 0,9$. Da sich die Radioaktivität in der organischen Phase nur in dem Fleck mit $R_f = 0$ befand, kann diese Verbindung nur das mit Cl^- beladene Diamin sein.

Bei Permeabilitätsmessungen mit Cl^- wurde stets das Diazabicycloalkan (10, 10, 10), mit SO_4^{2-} das Diazabicycloalkan (14, 14, 14) in die Liposomen eingebaut. Die durch das Diamin erzielte Erhöhung der Geschwindigkeitskonstanten zeigt folgende Tabelle 3:

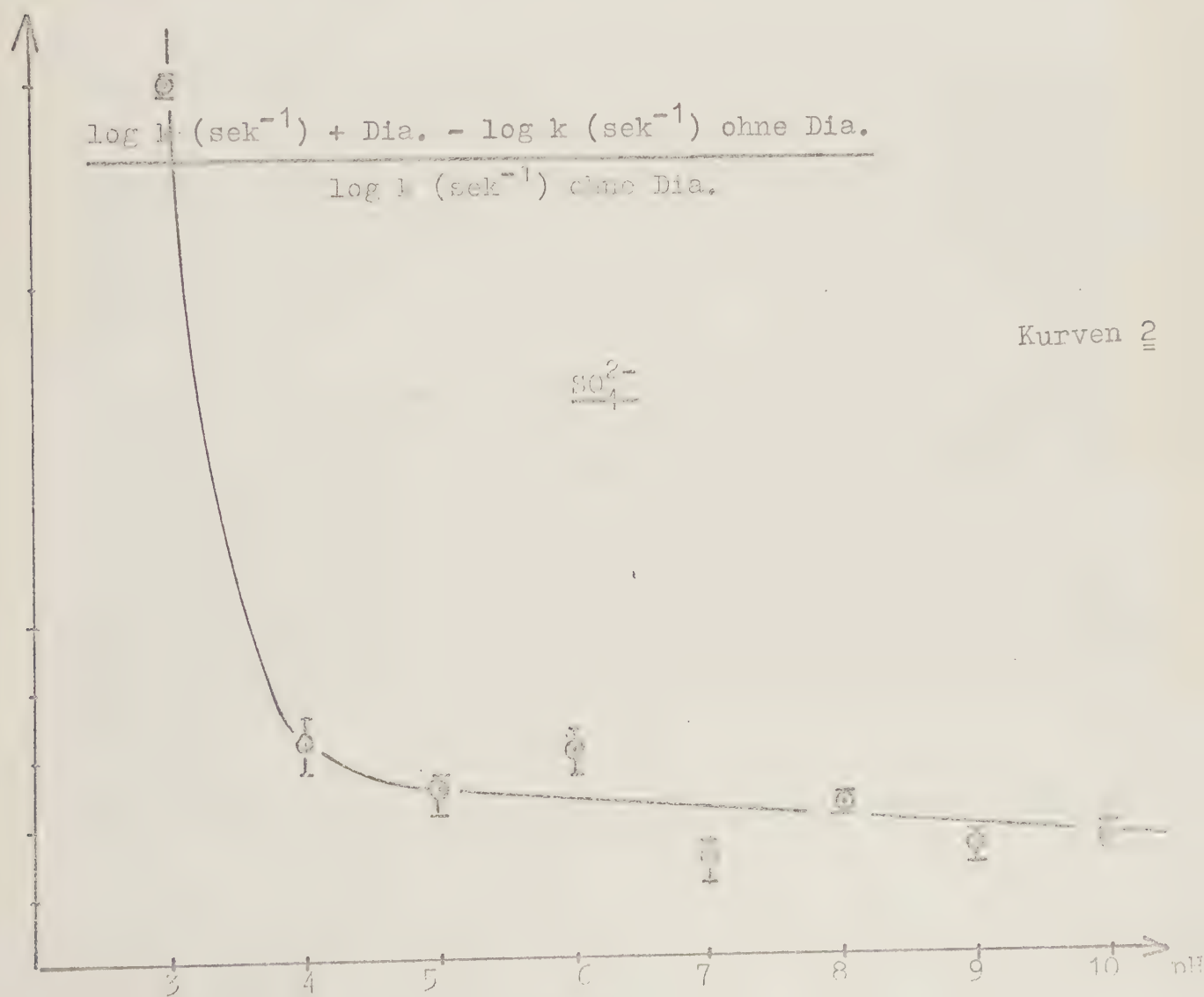
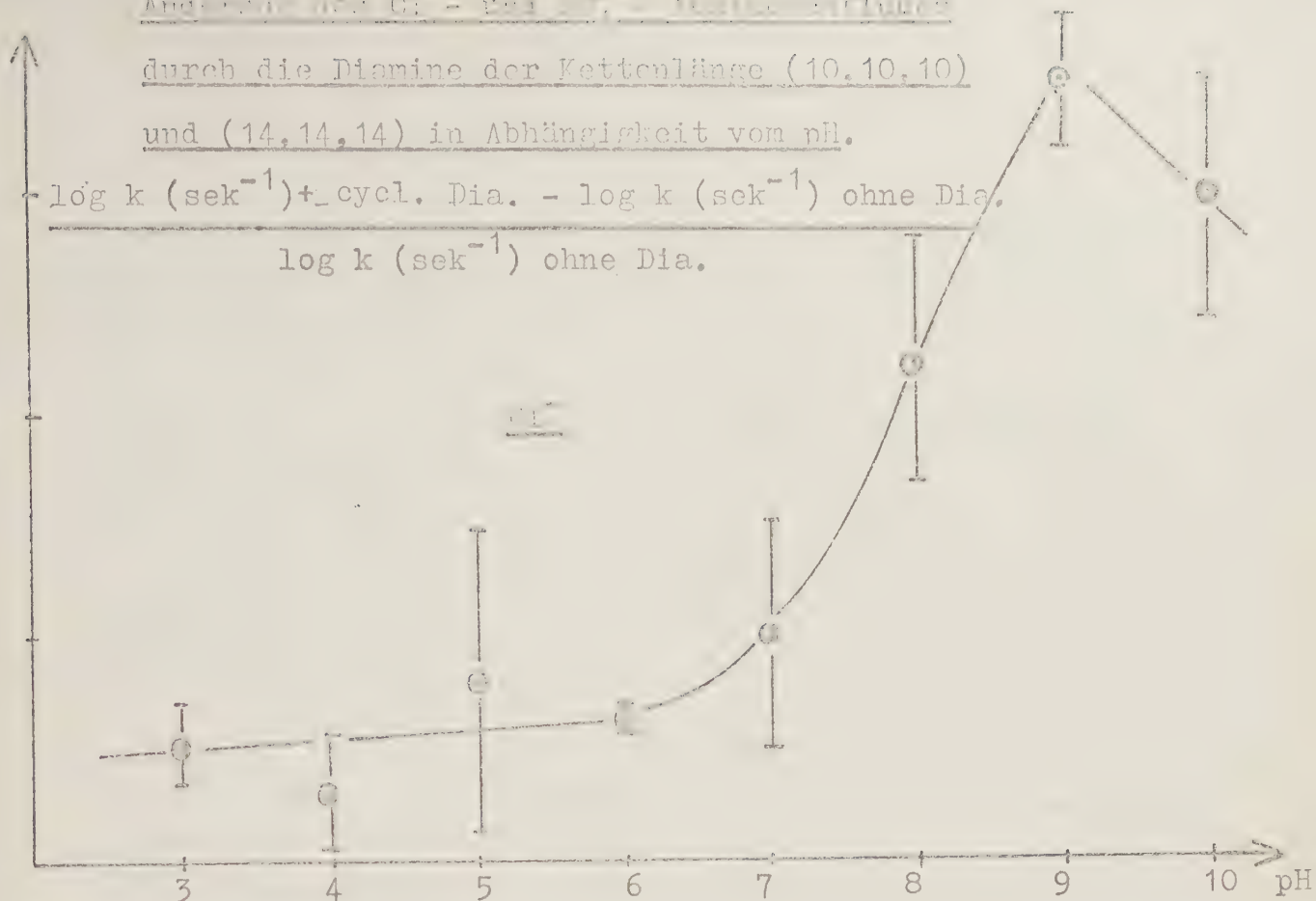
Geschwindigkeitskonstanten k (sek^{-1}) für den $\text{S}^{35}\text{O}_4^{2-}$ -Transport durch das Diamin der Kettenlänge (14, 14, 14), 20°C :

pH	Diamin	Nettofluß (sek^{-1})	Austauschfluß (sek^{-1})
7,4	mit	$8,26 \times 10^{-6}$	$1,65 \times 10^{-5}$
7,4	ohne	$8,89 \times 10^{-6}$	$9,76 \times 10^{-6}$
3,5	mit	$1,16 \times 10^{-4}$	$1,92 \times 10^{-4}$
3,5	ohne	$1,72 \times 10^{-5}$	$2,05 \times 10^{-5}$

Änderung der Cl^- - und SO_4^{2-} -Konzentrationen

durch die Diamine der Kettenlänge (10,10,10)

und (14,14,14) in Abhängigkeit vom pH.



Geschwindigkeitskonstanten k (sek^{-1}) für den Cl^{36-} -Transport durch das Diamin der Kettenlänge (10, 10, 10) bei pH 7,4, 25°C , $n = 6$:

	Nettofluß	SD
ohne cycl. Diamin	$8,49 \times 10^{-6}$	$\pm 1,36$
mit cycl. Diamin	$2,64 \times 10^{-5}$	$\pm 0,19$
	Austauschfluß	SD
ohne cycl. Diamin	$1,95 \times 10^{-5}$	$\pm 0,14$
mit cycl. Diamin	$5,20 \times 10^{-5}$	$\pm 0,46$
	Durch Valinomycin (10^{-6}M) induzierter Nettofluß	SD
ohne cycl. Diamin	$1,06 \times 10^{-5}$	$\pm 0,26$
mit cycl. Diamin	$6,02 \times 10^{-5}$	$\pm 1,2$

Betrachtet man die Abhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten vom pH, so liegt das Maximum der durch das Diamin hervorgerufenen Erhöhung des Flußes für Cl^{-} bei pH 9. Für SO_4^{2-} wurde im neutralen pH-Bereich nur eine minimale Beschleunigung gemessen, hingegen war bei pH 3 der Fluß um das dreißigfache erhöht (Kurven 2).

Diamine mit den Kettenlängen von (10, 10, 10), (12, 12, 12) und (14, 14, 14) bewirkten für Cl^{-} eine gleiche starke Flußerhöhung. Das SO_4^{2-} -Ion wurde ausschließlich vom Diamin mit dem größten Käfigdurchmesser transportiert.

Die auffallende Abhängigkeit des Penetrationsvermögens von der Kettenlänge des Diamins zeigt zugleich, daß die Erhöhung der Permeabilität nicht einfach durch eine Detergentienwirkung zustande kam, sondern, daß eine spezifische Carrierfunktion vorlag.

Zur weiteren Charakterisierung der Eigenschaften des Carriers

wurde bei gleichbleibender Lipid- und Anionenkonzentration, die Diaminkonzentration variiert.

Der Netto- und Austauschfluß des Cl^- konnte auch bei zehnfacher Änderung der Konzentration des Carriers nicht verändert werden. Für SO_4^{2-} ergab eine Konzentrationsverminderung auf ein Fünftel der üblichen Menge ($1,14 \times 10^{-4}$ mMol Diamin / ml Liposomen) eine Verdoppelung des Flußes, was einer 70-fachen Erhöhung der Permeabilität gegenüber einer Kontrolle ohne Carrier entspricht.

DISKUSSION

Der Mechanismus des Anionentransportes durch die Lipiddoppelschichten der Liposomen ist trotz zahlreicher Untersuchungen noch ungeklärt.

Da die Cl^- -Penetration mit abnehmendem pH-Wert zunimmt, könnte angenommen werden, daß die Cl^- -Ionen im Inneren des Lipids in dem die Dielektrizitätskonstante sehr klein ist, mit H^+ -Ionen unter Bildung von HCl reagieren (5). Dies erscheint zudem plausibel da, wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, die Penetration der SO_4^{2-} - Ionen im pH-Bereich in dem sich die Cl^- -Permeabilität erheblich ändert, nahezu konstant bleibt. Eine quantitative Behandlung zeigte jedoch, daß die Versuchsergebnisse nur qualitativ der vorausgesagten pH-Abhängigkeit entsprechen. Überlegungen die eine Reaktion des Cl^- mit einem Kation, die Gegenwart geringer Mengen spezifischer Carriermoleküle oder die Komplexbildung zwischen Cl^- und Lecithin (flip-flop Austausch des Lecithins (6) in Betracht ziehen, führen ebenfalls zu keiner plausiblen Erklärung des Transportmechanismus.

Die vorliegende Arbeit hat ferner gezeigt, daß die verwendeten cyclischen Diamine eine Carrierfunktion ausüben. Vergleicht man die Effektivität des K^+ -Carriers Valinomycin

mit der des Cl^- -Carriers Diazabicyclo (10, 10, 10)-alkan so liegt sie für letzteren, gerechnet auf gleiche Konzentrationen, um den Faktor 10^3 - 10^4 niedriger. Dies könnte darauf beruhen, daß die Geschwindigkeitskonstanten der einzelnen Penetrationsstufen oder die lokalen Konzentrationen des beladenen und unbeladenen Carriers niedriger als beim Valinomycin sind. Da wie bei der Bestimmung des Verteilungskoeffizienten gezeigt wurde die Überschreitung eines bestimmten Schwellwertes der Diaminkonzentration zur abrupten Cl^- -Aufnahme führt, ist wahrscheinlich aber auch eine Micellenbildung der Grund für die geringe Penetrationsgeschwindigkeit. Anscheinend wird durch ein komplexes Zusammenwirken zusätzlicher Reaktionen im Membraninneren der Transportmechanismus des Diamins modifiziert.

EXPERIMENTELLER TEIL

Lecithin wurde nach einem Verfahren von Hanahan aus Eigelb isoliert (7) und über Al_2O_3 - und SiO_2 -Säulen gereinigt. Cholesterin war ein Produkt der Fa. Merck. Das gereinigte Lecithin wurde als 2 %-ige Stammlösung in Chloroform : Methanol = 3 : 1 unter Stickstoff bei -8°C aufbewahrt.

Zur Darstellung der Liposomen für ein typisches Dialyseexperiment wurden 2 ml der 2 %-igen Lecithin-Stammlösung mit 19,4 mg Cholesterin in das Gefäß für die spätere Beschallung gegeben, was einen Gesamtlipidgehalt von 102 μMol ergab.

Nach Verdampfen des Lösungsmittels in einem N_2 -Strom wurde zu dem trockenen Lipid 2,5 ml der jeweiligen Salzlösung (KCl , KJ bzw. Na_2SO_4) von entsprechender Molarität in 10 mmolarem Glycylglycinpuffer oder in 15 mmolarem Phosphatpuffer des gewünschten pH-Wertes und 0,5 ml der jeweiligen radioaktiven Salzlösung (KCl^{36} 15-20 μc ; KJ^{131} 15-20 μc bzw. $\text{Na}_2\text{S}^{35}\text{O}_4$ 50 μc) gegeben. Nach Beschallung mit einem Branson B 12-Rüsselbeschaller unter Eiskühlung bis zur konstanten Lichtabsorption wurden

2,5 ml der Liposomensuspension über eine Sephadex G50-Säule filtriert, um das extrazelluläre Salz abzutrennen. Von der nach einer durchschnittlichen Retentionszeit von 30 Minuten eluierten Liposomenfraktion, wurden 0,1 ml zur Radioaktivitätsmessung verwendet. Zur Messung des Austauschflusses wurden 0,4 ml der Liposomen (4,5 μ Mol Lipid) mit einer Mikropipette in den Stempel der Dialyseapparatur gefüllt und dazu, wenn die Liposomen mit Cl^{36-} - oder $\text{S}^{35}\text{O}_4^{2-}$ beladen worden waren, 0,4 ml einer 100 mmolaren KCl- bzw. Na_2SO_4 -Lösung, mit 10 mMol Glycylglycin gepuffert und vortemperiert hinzugegeben ($t = 0$). Zur Messung des Nettoflusses oder induzierten Nettoflusses wurden 0,4 ml eines 100 mmolaren Glycylglycin-Puffers oder 0,4 ml einer 100 mmolaren Rohrzuckerlösung im selben Puffer zugefügt. Der verschlossene Dialyse-Stempel wurde dann in ein temperiertes Dialyseglass, das 5 ml derselben KCl-, Na_2SO_4 - bzw. Pufferlösung enthält, gesteckt und in Zeitabständen von 15 - 60 Minuten in ein anderes Dialyseglass mit derselben Lösung überführt. Vom Dialysat wurde zur Radioaktivitätsbestimmung jeweils 1 ml abgenommen. Aus den Zählergebnissen wurde mit Hilfe der Formel $\log \frac{X_0 - X}{X} = - \frac{kt}{2,3}$ die Geschwindigkeitskonstante $k(\text{sek}^{-1})$ berechnet.

LITERATUR

1. H. Passow, J. Mem. Biol., 6, 233 (1971)
2. E. Overton, Vierteljahresschr. Naturforsch. Ges., Zürich, 40, 159 (1895)
- 3a. D. C. Tosteson, Acta physiol. scan., 46, 19 (1959)
- b. H. Passow, P. G. Wood in, Drugs and Transport Processes, ed. B. A. Callingham, London 1974
4. H. E. Simmons, C. H. Park, J. Am. Chem. Soc., 90, 2428 (1968)
- 5a. H. Hauser, D. Oldani, M. C. Phillips, Biochemistry, 12, 4507 (1973)

- b.A. D. Bangham, Ann. Rev. Biochem., 41, 753 (1972)
6. R. D. Kornberg, H. M. McConnell, Biochemistry, 10, 1111 (1971)
7. H. Hanahan, J. Biol. Chem., 192, 623 (1951)

ZUSAMMENFASSUNG

1. Die Herstellung von einschaligen Liposomen wurde standardisiert und ein neues Dialyseverfahren ausgearbeitet.
2. Die Geschwindigkeit des $\text{Cl}^- / \text{Cl}^-$ -Austausches ist etwa doppelt so hoch, wie die des $\text{SO}_4^{2-} / \text{SO}_4^{2-}$ -Austausches.
3. Der $\text{Cl}^- / \text{Cl}^-$ -Austausch ist bei pH 7,4 um den Faktor 2 höher als der Cl^- -Nettofluß in ein Cl^- -freies Außenmedium. Bei gleichzeitiger Zugabe von Valinomycin und 2,4-DNP erreicht der Cl^- -Nettofluß dieselbe Geschwindigkeit wie der $\text{Cl}^- / \text{Cl}^-$ -Austauschfluß.
4. Die Geschwindigkeitskonstanten des Cl^- -Austausches steigen mit abnehmendem pH-Wert an, hingegen sind die Geschwindigkeitskonstanten des SO_4^{2-} -Flußes zwischen pH 5 - 10 unabhängig vom pH.
5. Der Einbau von 1, (16)-Diazabicyclo(14, 14, 14)-alkan in die Liposomen bewirkt eine Erhöhung des Netto- und Austauschflusses von Cl^- und SO_4^{2-} . Wird dagegen der Carrier 1, (12)-Diazabicyclo(10, 10, 10)-alkan eingebaut, so tritt eine Steigerung des Cl^- -nicht aber des SO_4^{2-} -Flußes ein.
6. Der Cl^- -Austauschfluß wird im neutralen pH-Bereich durch das Diamin um das dreifache, der SO_4^{2-} -Fluß bei pH 3 um das dreißigfache durch das Diamin gesteigert.
7. Die Steigerung des Cl^- - und SO_4^{2-} -Flußes ist nur im geringen Maße von der Konzentration des cyclischen Diamins abhängig.

Lebenslauf

Ich wurde am 14. Juni 1944 als Tochter der Eheleute Ikram und Maria Sihoruf, geb. Fajsewa, in Schrobenhausen (Obb.) geboren.

Bildungsweg:

Volksschule: September 1950 - Juli 1955 Pestalozzischule, Ingolstadt

Oberrealschule: September 1955 - Juli 1964 Mädchenoberrealschule der Franziskanerinnen, Ingolstadt

Studium der Chemie: WS 1964/65 - SS 1970 Technische Universität, München

Diplom-Vorprüfung: 5. Juli 1967

Diplom-Hauptprüfung: März 1970

Abschluß der Diplomarbeit: 24. September 1970

Research Assistant: Oktober 1970 - September 1972 Protein Research Lab., University of Pittsburgh, USA

Beginn der Dissertation: November 1972

Meine akademischen Lehrer waren:

Prof. Dr. Borchert, Prof. Dr. Dr. H. Fasold, Prof. Dr. E. O. Fischer, Prof. Dr. Fritz, Prof. Dr. Gerischer, Prof. Dr. H. Hartmann, Prof. Dr. K. Hofmann, Prof. Dr. Jander, Prof. Dr. Kresze, Prof. Dr. Lüscher, Prof. Dr. Dr. Mutschler, Prof. Dr. H. Passow, Prof. Dr. Patat, Prof. Dr. W. Steglich, Prof. Dr. Weygand.

